

沼液对植物病害的防治效果及机理研究

I :对植物病原真菌的抑制效果及抑菌机理初探

马 艳¹, 李 海², 常志州^{1*}, 徐跃定¹, 张建英¹

(1.江苏省农科院农业资源与环境研究所, 南京 210014; 2.河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002)

摘 要:采用菌丝生长抑制和分生孢子萌发抑制的试验方法,以草莓枯萎病菌为靶标病原菌,研究了江苏省内运行稳定的 21 个大型沼气工程的沼液及其无菌滤液对草莓枯萎病菌的生长抑制特性。结果表明,所有沼气工程的沼液对草莓枯萎病菌的菌丝生长都有不同程度的抑制作用,不同运行年限的沼气池沼液以及不同发酵原料的沼液对草莓枯萎病菌的抑制效果均无显著差异,但不同贮液阶段的沼液对其抑菌效果影响显著。沼液的无菌滤液对草莓枯萎病菌菌丝的生长没有抑制作用;沼液及其无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子的萌发均有不同程度的抑制作用,猪粪沼液及其无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的抑制作用好于牛粪沼液。沼液对生产上常见的 5 种植物病原真菌的抑制效果有显著差别。沼液中的拮抗微生物是沼液抑菌防病的主要因子。

关键词:沼液;草莓;枯萎病菌;植物病原真菌

中图分类号:X172 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)02-0366-09

Biocontrol Effect and Mechanism of Biogas Slurry on Plant Disease I: Primary Study of Growth Inhibition Effects and Mechanism on Phytopathogen Fungi

MA Yan¹, LI Hai², CHANG Zhi-zhou^{1*}, XU Yue-ding¹, ZHANG Jian-ying¹

(1. Institute of Agricultural Resource and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China; 2. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Inhibition effects of biogas slurry (BS) coming from 21 biogas projects which located in large-scale livestock farms and have been run steadily more than half a year and its sterilized filter on *Fusarium axysporum f.sp. fragariae* of strawberry were studied with the method of mycelia growth and spore germination. The results showed: All of BS sampled from 21 biogas projects appeared to inhibit mycelia growth of *F. axysporum f.sp. fragariae* to various degree. No significant difference was observed about inhibition effect of BS from 21 biogas projects which have been running with different running time or different fermentation raw material, but significant difference was obtained in the same BS but in its different storage stage. So storage stage of BS impacted strongly growth inhibition effect on mycelium of *F. axysporum f.sp. fragariae*. Sterilized filter prepared by micro-membrane filtering from BS lost its inhibition effect on mycelium growth of *F. axysporum f.sp. fragariae*. While both BS and its sterilized filter appeared inhibition effect on spore germination of *F. axysporum f.sp. fragariae* with different degree. The inhibition effect of BS coming from pig manure and its sterilized filter was better than that of cow manure. Inhibition effect of both BS on five phytopathogens of strawberry showed significant difference: growth inhibition rate with 73%~87% on *F. axysporum f.sp. fragariae*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. and *Verticillium dahliae* Kelb was obtained, while to *Phytophthora capsici*, we got growth inhibition rate with 38% and no inhibition effect on *Pythium aphanidermatum*. Anti-microorganisms survived in BS played an important role in mycelia growth inhibition of phytopathogens and disease control of plant in consequence.

Keywords: biogas slurry; strawberry; *Fusarium axysporum f.sp. fragariae*; phytopathogen fungi

收稿日期: 2010-05-26

基金项目: 江苏省科技厅国际合作项目(BZ2009101), 江苏省农业科技自主创新资金项目[ex(09)623]

作者简介: 马 艳(1971—), 江苏徐州人, 博士, 副研究员, 主要从事农业废弃物肥料化利用及设施作物连作障碍防治研究。

E-mail: myzjtzyn@hotmail.com

* 通讯作者: 常志州 E-mail: czhizhou@hotmail.com

沼液在农业上的应用有悠久的历史,使用沼液替代化肥和农药,可减少20%以上的化肥和农药施用量,改良土壤的性状并显著改善农产品的品质^[1-8]。前人的研究也表明沼液对许多植物病原真菌有明显的抑制作用^[9-10],能显著降低某些病害的发生率^[11-14],可以发展成一种替代化学农药防治某些植物病害的有效手段。但实际应用中,也发现沼液对病害的防治效果稳定性和重复性差^[15-18]。

大量的文献提及沼液含有丰富的有效矿质养分、氨基酸、维生素和激素等活性物质,并且把沼液防病的作用归结于其促进作物生长从而间接提高了作物的抗病性或者归结为沼液中的抗菌物质起到防病作用^[19-23],但对沼液中含有的大量抑菌防病的微生物却鲜见报道,而这些微生物可能在沼液的抑菌防病功效中发挥着重要作用。同时,从大量关于沼液田间应用的报道发现,许多沼液的应用方法缺乏科学性,应用效果缺乏可靠性,对既定作物病害的防效可预见性差。究其原因,关键是对沼液中发挥作用的主要因素及其抑菌防病机理缺乏了解和研究。因此,阐明沼液的抑菌效果及相关的作用机理,对沼液的科学应用及提高对植物病害的防治效果具有重要的指导意义。

本研究以目前生产上急需解决且研究较少的草莓枯萎病菌为防治对象,研究不同运行年限、不同发酵原料的沼液对草莓枯萎病菌的生长抑制效果,并考虑草莓枯萎病菌在土壤中的主要存在形态,研究了沼液及其无菌滤液对枯萎病菌菌丝生长和对分生孢子萌发的影响;同时,还开展了沼液对生产上常见的5种植物病原真菌的抑制效果研究。希望通过本研究能初步阐明沼液复杂成分中对植物病原真菌有生长抑制作用的主要因子,对将来沼液的成分调控及提高沼液在田间对作物病虫害的防治效果提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

沼液:所有沼液样品取自江苏省内21个运行稳定的大型沼气工程,主要分布在南京、常州、无锡、苏州、南通、盐城、泰州、徐州、盐城、宿迁10个城市。其中川田、金芙蓉和姜曲海的沼液是直接取自沼气厌氧发酵罐,其余的沼液均取自贮液罐,有氧化塘的沼气工程增加氧化塘中的沼液样品。所有样品均在取样当天放4℃冰箱保存待测。

病原菌:草莓枯萎病菌(*Fusarium axysporum* f.sp. *fragariae*)、草莓炭疽病菌(*Colletotrichum gloeospori-*

oides (Penz.) Sacc.)、草莓黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici* Leonian)、瓜果腐霉病菌(*Pythium aphanidermatum*)均分离自草莓发病植株,并由本实验室保存。

培养基:PDA培养基用于所有病原菌的平板纯培养及平板的菌丝生长抑制试验;绿豆汤液体培养基用于草莓枯萎病菌分生孢子的培养制备;牛肉膏蛋白胨培养基用于沼液中芽孢细菌的分离。

1.2 试验方法

1.2.1 草莓枯萎病菌菌饼及其分生孢子液的制备

草莓枯萎病菌菌饼的制备:挑取试管斜面保存的草莓枯萎病菌菌种转接到PDA平板上,置于28℃恒温培养箱中培养5d即获得新鲜菌丝,将直径5mm的打孔器沿菌落最前沿打孔获得新鲜的菌饼备用。

草莓枯萎病菌分生孢子的制备:在100mL绿豆汤培养基中接种草莓枯萎病菌的新鲜菌饼,27℃,150 r·min⁻¹振荡培养7d,获得分生孢子培养液。将培养液经灭菌的4层纱布过滤,收集滤液经8000 r·min⁻¹离心10min,倾掉上清液,用10mL无菌水重新悬浮分生孢子沉淀物制成孢子悬液备用。以上所有操作在无菌状态下进行。

1.2.2 沼液无菌滤液的制备

将沼液在4℃、2000 r·min⁻¹离心20min,收集上清液,将上清液经过孔径为0.22 μm的细菌滤膜,收集滤液即为沼液的无菌滤液。

1.2.3 沼液及其无菌滤液对草莓枯萎病菌菌丝生长的抑制试验

1.2.3.1 沼液对草莓枯萎病菌菌丝生长的抑制试验

采用平板菌丝生长抑制法。吸取1mL沼液样品加入到20mL、50~55℃的PDA培养基中,充分混匀倒平板。待平板凝固后在平板中央接种新鲜草莓枯萎病原菌菌饼(直径5mm)。空白为不加沼液样品的PDA培养基接种草莓枯萎病原菌,在28℃恒温培养箱中培养5d,测量病原真菌的菌落直径,每处理5个重复。抑菌率计算公式:

抑菌率%=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]×100

1.2.3.2 沼液无菌滤液对草莓枯萎病菌菌丝生长的抑制试验

采用平板抑菌圈法。在PDA平板中央接种1个直径5mm的草莓枯萎病菌菌饼,用打孔器在距草莓枯萎病菌菌饼2cm处,四周均匀打直径为8mm小孔3~4个,在孔中加入80 μL沼液的无菌滤液,对照加

80 μL 无菌水,将平板在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中静置培养 5 d,观察抑菌圈的有无或大小,每处理 5 个重复。

1.2.4 沼液及其无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响

1.2.4.1 沼液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响

将沼液在 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,收集上清液备用。吸取 2 μL 草莓枯萎病菌分生孢子悬液分别加到有凹面、经灭菌处理的载玻片上,再分别加入 2、4、6、8、10 μL 沼液上清液,所有处理均用无菌水补充到总体积为 15 μL ,对照为 2 μL 孢子悬液加 13 μL 无菌水,每个处理 3 个重复。载玻片放入培养皿中,培养皿底部用无菌湿润滤纸保湿,将培养皿于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。在培养的 0、2、4、6、8 h 后,在 40 倍显微镜下分别观察各个处理分生孢子的萌发状况,在每个视野中随即查数 100 个分生孢子,计算分生孢子萌发率。观察过程中及时补水保湿。

1.2.4.2 沼液无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响

试验方法同 1.2.4.1,只是将沼液替换为沼液无菌滤液。

1.2.5 沼液对 5 种植物病原真菌的生长抑制作用

试验方法同 1.2.3.1,只是在 PDA 平板中央分别接种 5 种不同的病原真菌,培养 5 d 后测量菌落直径,每个处理 5 个重复。

1.2.6 沼液中拮抗微生物的筛选

分别将来自坤兴和川田的两种沼液作试管梯度系列稀释,再分别吸取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释度的沼液 100 μL 均匀涂抹在牛肉膏蛋白胨平板上,将平板于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 3 d 后,挑取肉眼观察明显不同的菌落进一步纯化,获得纯培养的多个细菌菌株。

在 PDA 平板一侧的中央接种细菌菌株,在平板另一侧的中央接种草莓枯萎病菌菌饼,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 3 d,观察每个细菌菌株对草莓枯萎病菌是否有拮抗作用,筛选出拮抗菌。采用相同的方法,再将筛选到的拮抗菌分别与另外 4 种病原真菌做平板对峙培养,观察其是否有拮抗作用,每个处理 5 个重复。

所有数据的统计分析由 SAS9.1 统计软件完成。

2 结果与分析

2.1 沼液对草莓枯萎病菌菌丝生长及分生孢子萌发的抑制作用

2.1.1 不同运行年限、不同原料的沼气工程沼液对草莓枯萎病菌的生长抑制作用

在所调查的 21 个沼气工程中,5 个沼气工程以奶牛场粪水为原料,其余 16 个沼气工程以猪场粪水为原料。沼气池容量有 800、1 000、1 200、1 500 m^3 4 种规模,其中池容量为 800 m^3 的 7 个,占 33.3%;池容量为 1 000~1 200 m^3 的 12 个,占 57.1%;池容量为 1 500 m^3 的 2 个,占 9.5%。由表 1 可以看出,所有规模沼气工程的沼液对草莓枯萎病菌菌丝都有程度不同的生长抑制作用,抑制率为 51.7%~76.2%。

相同运行年限、以猪粪水原料、不同容量的沼气池沼液对病原菌的生长抑制效果的显著性分析表明,运行 0.5 a 的 4 个沼气工程,沼气池容量对沼液对病原菌的生长抑制率有显著性影响,抑菌率最高的是池容量 800 m^3 ,为 76.6%,抑菌率最低的是池容量 1 200 m^3 ,为 54.8%,另外还看到,即便是池容量相同的梅山和丰海 2 个沼液的抑菌率仍然有显著性差异,分别为 68.4%和 76.6%;运行 1~2 a 的 7 个沼气工程,沼气池容量对沼液对病原菌的生长抑制率也有显著性影响,但影响关系比较复杂(同样是来自池容量为 1 000 m^3 的 3 个沼液对病原菌的抑制率仍然有显著性差异),其中抑菌率最高的是池容量 1 000 m^3 ,为 72.7%,抑菌率最低的是池容量 1 200 m^3 ,为 54.8%;运行 2~3 a 的 3 个沼气工程沼液,来自 800 m^3 池容量的 2 个沼液的抑菌率差异不显著,但二者与来自 1 000 m^3 池容量的沼液的抑菌率差异显著,其中抑菌率最高的是池容量 800 m^3 ,为 76.1%,最低的是池容量 1 000 m^3 ,为 54.4%。综合看来,在以猪粪水为原料时,沼气池容量对沼液抑菌率的影响没有规律性。

相同沼气池容量、以猪粪水为原料、不同运行年限的沼液对病原菌的生长抑制效果的显著性分析表明,运行年限对沼液的抑菌效果没有规律性影响,例如,同是容量为 800 m^3 的沼气工程沼液,运行半年的丰海和运行 2~3 a 的坤兴、金康沼液对病原菌的生长抑制率没有显著差别;而相同的运行年限、相同的容量,如运行半年的梅山、丰海对病原菌的生长抑制率仍有显著性差异,分别是 68.4%、76.6%;运行 1~2 a 的六合、永丰沼液对病原菌的生长抑制率也有显著性差异,分别是 62.5%、57.1%;另外,对容量为 1 000 m^3 的沼气工程沼液,运行年限对沼液的抑菌效果的影响也没有规律性,如都是运行 1~2 a 的金谷、桃园、姜曲海,3 个沼液对病原菌的生长抑制率有显著性差异,分别是 72.7%、62.4%、58.3%,而运行年限分别是 2~3 a 及 3~4 a 的南洋和兴望,二者对病原菌的生长抑制率也有显著性差异。而对池容量为 1 200 m^3 的 3 个沼

表 1 不同运行年限、不同原料的沼气工程沼液对草莓枯萎病菌菌丝的生长抑制作用

Table 1 Growth inhibition effect of biogas slurry coming from different biogas projects on mycelium of

Fusarium oxysporum f.sp. fragariae of strawberry

沼气工程运行年限/a	沼气工程名称	沼气池容量/m ³	发酵原料	菌丝生长抑制率/%	菌丝生长平均抑制率/%
0.5	梅山	800	猪粪水	68.4±1.11 b ₁ (b ₁)	65.1
	丰海	800	猪粪水	76.6±0.79 a ₁ (a ₁)	
	东沙	1 000	猪粪水	60.5±0.75 c ₁ (c ₂)	
	华多	1 200	猪粪水	54.8±0.79d ₁ (b ₃)[b ₁]	
	泰来神	1 200	牛粪水	76.2±0.53 [a ₁]	
	维维	1 500	牛粪水	68.7±0.79	
1~2	六合	800	猪粪水	62.5±0.65 c ₂ (c ₁)	63.9
	永丰	800	猪粪水	57.1±1.47 d ₂ (d ₁)	
	金谷	1 000	猪粪水	72.7±0.95 a ₂ (a ₂)	
	桃园	1 000	猪粪水	66.4±1.58b ₂ (b ₂)	
	姜曲海	1 000	猪粪水	58.3±1.45 d ₂ (c ₂)	
	乾丰	1 200	猪粪水	64.5±1.13 bc ₂ (a ₃)	
	康乐	1 200	猪粪水	65.7±0.98 b ₂ (a ₃)	
	向阳	1 500	牛粪水	51.7±1.04	
	坤兴	800	猪粪水	76.1±1.48 a ₃ (a ₁)[a ₂]	68.3
	金康	800	猪粪水	74.5±1.14 a ₃ (a ₁)[a ₂]	
2~3	昌兴	1 000	猪粪水	54.4±1.51 b ₃ (d ₂)[b ₃]	
	金芙蓉	800	牛粪水	53.7±1.69 [b ₂]	
3~4	川田	1 000	牛粪水	72.7±1.45 [a ₃]	63.2
	南洋	1 000	猪粪水	58.8±1.56(c ₂)	
4~5	兴望	1 000	猪粪水	68.7±0.79(b ₂)	58.8
					68.7

注:①多重比较采用 Duncan 法,利用 SAS9.1 软件进行分析,表中数值为 3 次重复的平均值,同列字母相同表示不同处理间无显著差异($P=0.05$, $n=3$)。②数字后第 1 个小写字母表示相同运行年限、猪粪水原料、不同容量的沼气池沼液对菌丝生长抑制率的差异,字母下标数字相同表示运行年限相同。③小括号里字母表示相同沼气池容量、猪粪水原料、不同运行年限对菌丝生长抑制率的差异,字母下标数字相同表示沼气池容量相同。④方括号中字母表示相同运行年限、相同沼气池容量、不同原料对菌丝生长抑制率的差异,字母下标数字相同表示沼气池容量和运行年限相同。

Note: ①Duncan statistics analysis and SAS9.1 software was used for multiple comparison. Data in form was average value of three replications. The letter outside brackets is analysis results of data in horizontal line and the letter inside brackets is analysis results of data. The same letter in the same vertical line means no significance ($P=0.05$, $n=3$). ②The first small letter after data means analysis results of inhibition effect of the same running time, the same fermentation material and different size of anaerobic pond, the same subscript digit means the same running time; ③ the letter in parentheses means analysis results of inhibition effect of same size of anaerobic pond, the same fermentation material and different running time, the same subscript digit means the same size of anaerobic pond; ④the letter in square brackets means analysis results of inhibition effect of the same running time, the same size of anaerobic pond, different fermentation material, the same subscript digit means the same size of anaerobic pond and the same running time.

液,运行年限 1~2 a 的乾丰和康乐沼液对病原菌的生长抑制率没有显著差异,分别为 64.5%、65.7%,二者与运行半年的华多沼液的抑菌率 54.8%有显著差异。

相同运行年限、相同沼气池容量、不同原料对菌丝生长抑制率的差异的显著性分析表明,原料对沼液的抑菌率有显著影响,如运行 0.5 a、池容量为 800 m³ 的华多和泰来神两处沼液的抑菌率分别为 54.8%、76.2%,表现为牛粪水原料的沼液的抑菌率远高于猪粪水原料;而运行 2~3 a、池容量为 1 000 m³ 的昌兴和川田两处沼液的抑菌率分别为 54.4%、72.7%,也同样表现为牛粪水原料沼液的抑菌率远高于猪粪水原料;

同样是运行 2~3 a、池容量为 800 m³ 的坤兴和金康、金芙蓉 3 处沼液的抑菌率分别为 76.1%、74.5%、53.7%,表现为猪粪水原料沼液的抑菌率远高于牛粪水原料,且呈显著性差异。

综合看来,沼气池容量、沼气发酵原料以及运行年限对沼液抑菌率的影响极其复杂,没有明确的规律性。鉴于此,我们将沼气池运行年限、沼气池容量和发酵原料作为 3 个处理,利用 SAS9.1 软件进行统计分析,从表 2 可以看出, $P=0.214 0>0.05$,处理间对沼液的菌丝生长抑制率没有显著差异。其中,变异因子运行年限的 P 值为 0.133 9,变异因子沼气池容量的 P

值为 0.287 6,变异因子发酵原料的 P 值为 0.865 1,均大于 0.05,各变异因子和菌丝生长抑制率之间的相关性没有统计学意义。由此推测,沼气发酵的运行模式或原料的进、出料频率可能是最终影响沼液抑菌率的因素,这方面还需要做深入的研究分析。

表 2 不同运行年限、不同容量、不同原料的沼气工程沼液对草莓枯萎病菌菌丝的生长抑制率的统计分析结果

Table 2 Analysis result of inhibition rate of biogas slurry from different projects on mycelium growth of *Fusarium axysporum* f.sp. fragariae of strawberry

变异来源	自由度	平方和	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
处理间	8	707.343 500	88.417 938	1.41	0.214 0
年限	4	462.868 321 4	115.717 080 4	1.84	0.133 9
容量	3	242.646 607 1	80.882 202 4	1.29	0.287 6
原料	1	1.828 571 4	1.828 571 4	0.03	0.865 1
误差	54	3 389.025 071	62.759 724		
总变异	62	4 096.368 571			

2.1.2 氧化塘沼液对草莓枯萎病菌菌丝生长的抑制作用
 在所调查的 21 个沼气工程中,有 5 个沼气工程设有氧化塘,其中有二级、三级氧化塘的各 1 个,有一级氧化塘的 3 个,其余沼气工程大都直接将沼液施用于农田,还有个别沼气工程将沼液经湿地或水生植物塘处理后达标排出。

由表 3 看出,随着沼液的逐级氧化,抑菌效果逐渐降低,昌兴沼液经三级氧化后,其抑菌效果比沼液降低了 30%,差异达显著水平($P=0.05$);而梅山沼液经二级氧化后其抑菌效果比沼液降低了 36%,差异也达到显著水平($P=0.05$),但其余 3 个沼气工程的沼液经一级氧化后,氧化塘内沼液的抑菌效果与沼液相比没有

明显降低。氧化塘中的沼液由于自然絮凝沉淀、微生物的代谢活动和曝气,其中的氮、磷、钾、氨基酸、有机酸等养分及其对病菌有生长抑制作用的成分以及微生物数量均普遍低于沼液罐中的沼液(待发表资料),从而可能影响其抑菌效果;同多级氧化塘相比,可能一级氧化塘内沼液悬浮物、大量养分、微生物及微量元素的去除率不高,使得沼液的抑菌效果没有明显降低。

2.1.3 沼液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响

由图 1 可见,在本实验条件下,两种原料的沼液对草莓枯萎病菌分生孢子的萌发均有一定的抑制作用。在培养的 8 h 时间内,猪粪沼液对分生孢子萌发的抑制率在 18%~42.3%,且随着沼液用量的增加,其抑制效果增强,加量为 10 μL 时抑制效果最好,抑制率为 42.3%;牛粪沼液对孢子萌发的抑制率在 13.3%~25.3%,抑制效果基本随着沼液浓度的增加而增强,但加量为 8 μL 时抑制率最高,为 25.3%,这一点不同于猪粪沼液。总体看来,猪粪沼液的抑菌效果好于牛粪沼液,但当培养时间大于 10 h 后,两种沼液对病原菌的抑制作用均逐渐消失,原因有待进一步研究。

2.2 沼液无菌滤液对草莓枯萎病菌菌丝生长及分生孢子萌发的抑制作用

2.2.1 沼液无菌滤液对草莓枯萎病菌菌丝生长的抑制作用

在固体培养基平板的圆孔中分别加入 5 个不同沼气工程沼液的无菌滤液,适温培养数天后,在圆孔边没有观察到抑制病菌生长的抑菌带(图 2),表明沼液经细菌滤膜过滤后,其无菌滤液丧失了对草莓枯萎病菌的生长抑制作用。

与 2.1.1 的试验结果相结合,可以初步推测沼液中所含的微生物是其抑制病菌生长的主要因子。

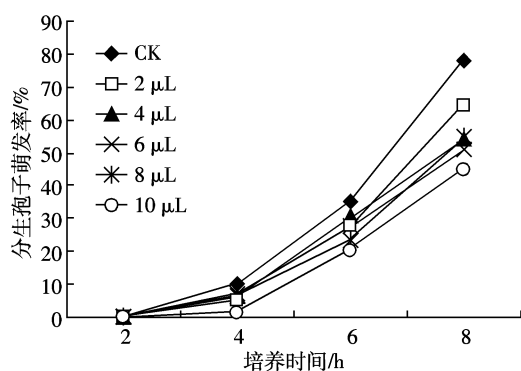
表 3 氧化塘沼液对草莓枯萎病菌菌丝生长的抑制率(%)

Table 3 Influence of biogas slurry in oxidation pond on mycelium growth of *Fusarium axysporum* f.sp. fragariae of strawberry(%)

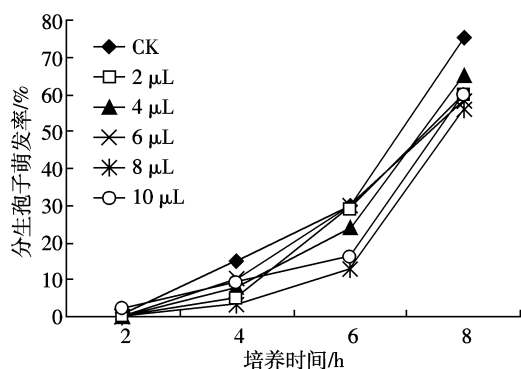
沼气工程名称	发酵原料	沼液不同贮液阶段			
		沼液	一级氧化塘	二级氧化塘	三级氧化塘
昌兴	猪粪水	79.2±0.86a(a)	61.6b±0.97b(c)	59.5±1.12b(a)	54.4±0.97c
梅山	猪粪水	68.4±1.08a(bc)	46.7±0.86b(d)	43.2±0.65b(b)	—
兴望	猪粪水	70.5±0.93a(b)	69.4±1.14a(b)	—	—
桃园	猪粪水	66.2±0.75a(c)	71.±1.02a(ab)	----	----
川田	牛粪水	72.7±1.12a(b)	76.6±0.97a(a)	—	—

注:多重比较采用 Duncan 复全距比较法,表中数值为 5 次重复的平均值,括号外字母为同行比较结果,括号中字母为同列比较结果,同行字母相同或括号中同列字母相同,表示处理间无显著差异($P=0.05$, $n=5$)。下同。

Note:Duncan statistics analysis was used for multiple comparison. Data in form was average value of five replications. The letter outside brackets is analysis results of data in horizontal line and the letter inside brackets is analysis results of data in vertical line. The same letter outside or inside brackets means no significance in different treatments ($P=0.05$, $n=5$). The same below.



A.猪粪沼液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响



B.牛粪沼液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响

图1 沼液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响

Figure 1 Influence of biogas slurry on spore germination of *Fusarium axysporum* f.sp. fragariae of strawberry

2.2.2 沼液无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的抑制作用

由图3可见,两种原料沼液的无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响比较复杂,明显不同于两种原料的沼液对分生孢子的抑制效果(图1)。当猪粪沼液的无菌滤液用量分别为2、4 μL时不但没有抑菌效果,用量为2 μL时反而使孢子萌发率提高了10%,

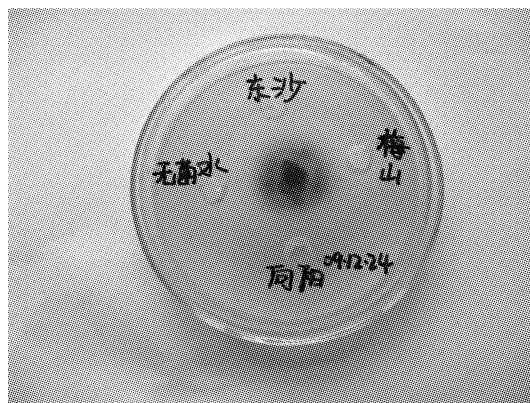
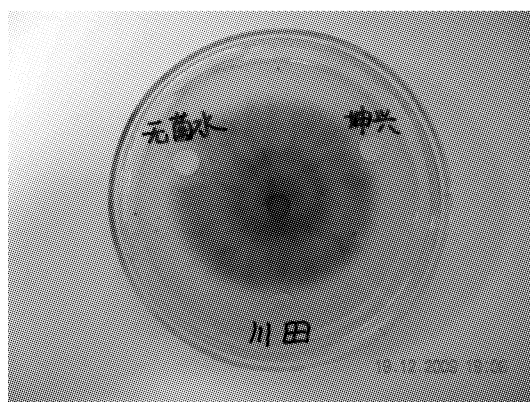
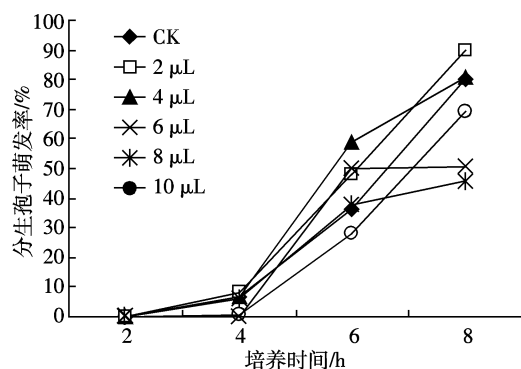
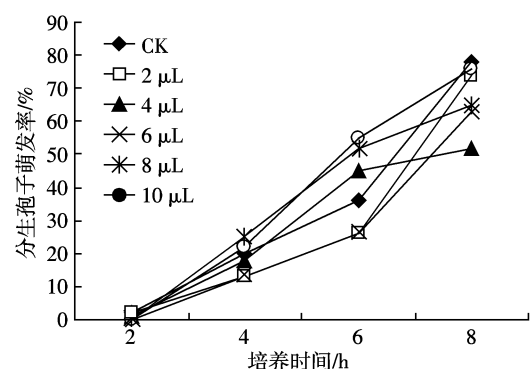


图2 沼液无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响

Figure 2 Inhibition effect of sterilized filter of biogas slurry on spore germination of *Fusarium axysporum* f.sp. fragariae of strawberry

A.猪粪沼液无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响



B.牛粪沼液无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的影响

图3 沼液无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子萌发的抑制作用

Figure 3 Inhibition effect of sterilized filter of biogas slurry on mycelium growth of *Fusarium axysporum* f.sp. fragariae of strawberry

好于牛粪沼液的无菌滤液。

2.3 沼液对 5 种常见植物病原真菌的生长抑制作用

分别来自川田、坤兴的两种原料的沼液对 5 种病原真菌中的每一种病原菌的生长抑制作用相近(表 3、图 4),即对同种病原菌,两种原料沼液的抑菌率之间没有显著性差异。而同一种沼液对 5 种病原菌的生长抑制率之间有显著差异,如川田沼液对草莓黄萎病菌的抑制率最高,为 87%,对草莓枯萎病菌、草莓炭疽病菌的抑制率分别为 73%、78%,对辣椒疫霉病菌的抑制率显著低于前面 3 种病原菌,为 39%;坤兴沼液对病原菌的抑制作用也呈现类似的规律,即对草莓黄萎病菌的抑制率最高,为 85%,对草莓枯萎病菌、草莓炭疽病菌的抑制率分别为 73.6%、80%,对辣椒疫霉病菌的抑制率显著低于前面 3 种病原菌,为 38%;两种沼液对瓜果腐霉病菌均没有抑制效果。

从川田、坤兴两种沼液中分别分离到了 1 株数量上占优势的芽孢细菌,并将这两株芽孢细菌分别与 5 种病原菌进行了平板对峙培养试验,观察其对病原菌的拮抗效果。由图 4 可知,分离到的 2 株芽孢细菌的抑菌效果与相应沼液的抑菌效果相一致,表明分离到的拮抗芽孢细菌在沼液的抑菌功能中发挥主要作用。

本研究中选用的 5 种病原真菌是引起植物土传病害的主要真菌,在土壤中长期、大量并存,特别是在连作的土壤中,病原菌的种类更加复杂多样。在最新的真菌分类系统中,草莓枯萎病菌、草莓炭疽病菌、草莓黄萎病菌属于半知菌亚门,是真菌中进化程度最高的一类,细胞壁的主要成分是几丁质;而辣椒疫霉病菌和瓜果腐霉病菌属于鞭毛菌亚门,是真菌中进化程度最低的一类,细胞壁的主要成分是纤维素。初步推测,沼液对这两类病原菌的抑制效果的显著差别可能与病原菌的细胞壁成分有关,但确切的作用机理差别尚需进一步探索。

3 讨论

国内有关沼液在草莓上应用效果已有诸多研究报道^[24-28],深入分析已有的结果可以发现:绝大部分研究仅关注施用沼液对草莓产量、品质及生理效应的影响,而没有进一步探索是沼液中的何种成分在起作用



A:川田沼液对 5 种病原真菌的生长抑制作用;B:从川田沼液中分离到的芽孢细菌对 5 种病原真菌的生长抑制作用;C:坤兴沼液对 5 种病原真菌的生长抑制作用;D:从坤兴沼液中分离到的芽孢细菌对 5 种病原真菌的生长抑制作用。

A:Growth inhibition effect of biogas slurry from Chuantian project on five phytopathogens;B:Growth inhibition effect of bacillus isolated from Chuantian biogas slurry;C:Growth inhibition effect of biogas slurry from Kunxing project on five phytopathogens;D:Growth inhibition effect of bacillus isolated from Kunxing biogas slurry.

图 4 沼液及其拮抗菌对 5 种植物病原真菌的生长抑制作用

Figure 4 Growth inhibition effect of biogas slurry and its antagonistic microorganisms on five phytopathogens

或起主要作用,更未见对不同运行年限及不同发酵原料的大型沼气工程的沼液对植物病原菌抑制作用影响的相关报道。

研究表明,运行半年以上的大型沼气工程所产生的沼液对植物病原真菌均有不同程度的生长抑制作用,运行时间与发酵原料对沼液的抑菌效果没有显著影响。研究还发现两种原料的沼液经细菌滤膜过滤除去其中的微生物后,其相应的无菌滤液均丧失了对草莓枯萎病菌菌丝的生长抑制作用,由此可以初步推测,沼液中的微生物是抑制草莓枯萎病菌菌丝生长主要的因子。而沼液及其无菌滤液对草莓枯萎病菌分生孢子的萌发均有抑制效果,且二者对分生孢子萌发的抑制效果几乎没有差别,这一结果明显不同于沼液与其无菌滤液对菌丝的抑制效果。分析原因如下:不管是化学农药还是生物农药,对菌丝和对分生孢子的抑

表 3 两种沼液对 5 种植物病原真菌的菌丝生长抑制率(%)

Table 3 Growth inhibition effect of two biogas slurry on five phytopathogens mycelia(%)

项目	草莓枯萎病菌	草莓炭疽病菌	草莓黄萎病菌	辣椒疫霉病菌	瓜果腐霉病菌
川田沼液	73.5±0.76b(a)	78.3±1.02b(a)	87.1±0.83a(a)	39.8±1.02c(a)	0d(a)
坤兴沼液	76.4±0.59b(a)	80.6±0.97ab(a)	85.5±0.96a(a)	38.4±1.12c(a)	0d(a)

制作用均是有选择性的,即对分生孢子有效果的未必对菌丝有效果,反之亦然;通常情况下,抑制菌丝生长的 EC_{50} 要高于抑制分生孢子萌发的 EC_{50} , 因为分生孢子对抑制剂的敏感性要远高于菌丝,过滤后的沼液对分生孢子萌发有抑制效果而对菌丝生长没有抑制效果,可能是其中的抑菌物质本身对菌丝就没有抑制效果,也可能是因浓度太低而起不到抑制作用,而这种浓度的抑菌物质对分生孢子萌发却可能有抑制效果。沼液过滤前后对菌丝生长的抑制效果有显著差别说明沼液中的微生物是其抑菌的主要因子,而对分生孢子的抑制作用没有显著差别说明沼液中的抑菌物质可能是抑制分生孢子萌发的主要因子,但总体看来对分生孢子萌发的抑制作用较弱且持续时间短,而对菌丝的抑制作用较强烈且持续时间较长。

沼液对植物上常见的5种病原真菌的抑菌效果试验从拮抗微生物角度初步解释了许多前人报道的沼液的抑菌防病效果可预见性和重复性差的原因所在,即某种沼液对不同病原菌的抑制作用是有选择性的,不是对所有病原菌都有抑制效果。疫霉菌和腐霉菌是广泛存在于土壤和空气中的病原真菌,可以侵染草莓、西瓜、辣椒、黄瓜、大豆、棉花等多种经济作物。因此,在施用沼液作为防除作物病害的措施时,必须考虑病原菌种类的多样性和单一沼液效果的局限性,需要对沼液成分进行适当调控,有针对性地强化靶标明确的功效因子。

根据本研究初步结果,可以在沼液中强化对疫霉菌及腐霉菌有生长抑制作用的微生物或复配对二者有杀菌作用的化学农药,从而增强沼液抑菌防病的效果并拓宽其杀菌防病的范围。管莉波等研究报道将沼液分别与5种化学农药复配后对小麦叶枯病菌的抑制作用显著增强^[7]。Liu等研究报道在沼液中强化氨基酸后施用于莴笋明显降低了莴笋中硝酸盐的含量^[28]。当然,对沼液成分进行调控从而研发商业化的沼液产品将涉及到许多复杂的理论和技术问题^[29],需要物理、化学、植物营养学、微生物学及机械工程设备等多个学科的研究者共同参与,开展这方面的研究不但解决了沼液的高端利用问题,而且对全国沼气工程的进一步扩大推进、形成良性循环和农村生态环境保护及改善具有重大意义。

4 结论

在所调查的21个沼气大型工程中,所有沼液对草莓枯萎病菌的菌丝生长及分生孢子萌发都有不同程度的抑制作用;沼液的无菌滤液对草莓枯萎病菌菌丝没有抑制效果,但对草莓枯萎病菌分生孢子的萌发

均有不同程度的抑制作用。猪粪沼液及其无菌滤液的抑制作用好于牛粪沼液。沼液对生产上常见的5种土传病原真菌的抑制效果有选择性。沼液中的拮抗微生物是沼液抑菌防病的主要因子。

参考文献:

- [1] 刘文科, 杨其长, 王顺清. 沼液在蔬菜上的应用及其土壤质量效应[J]. 中国沼气, 2009, 27(1):43-46, 48.
LIU Wen-ke, YANG Qi-chang, WANG Shun-qing. A review on effect of biogas slurry on vegetables and soil[J]. *China Biogas*, 2009, 27(1):43-46, 48.
- [2] 王卫平, 朱凤香, 陈晓旸, 等. 沼液农灌对土壤质量和青菜产量品质的影响[J]. 浙江农业学报, 2010, 22(1):73-76.
WANG Wei-ping, ZHU Feng-xiang, CHEN Xiao-yang, et al. Effect of biogas slurry irrigation on soil quality and yield quality in *Brassica chinensis*[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2010, 22(1):73-76.
- [3] 张国治, 吴少斌, 王焕玲, 等. 大中型沼气工程沼渣沼液利用意愿现状调研及问题分析[J]. 中国沼气, 2009, 28(1):21.
ZHANG Guo-zhi, WU Shao-bin, WANG Huan-ling, et al. Survey and analysis on state quo of public intention for utilizing digestate from large and medium size biogas plants[J]. *China Biogas*, 2009, 28(1):21.
- [4] 代宇, 程国平. 沼液肥喷施对水稻秧苗素质及经济性状的影响[J]. 安徽农学通报, 2010(1):92, 176.
DAI Yu, CHENG Guo-ping. Influence of biogas fertilizer spray on rice seedlings and economical property[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2010(1):92, 176.
- [5] Thomas Terhoeven-Urselmans, Edwin Scheller, Markus Raubuch, et al. CO₂ evolution and N mineralization after biogas slurry application in the field and its yield effects on spring barley[J]. *Applied Soil Ecology*, 2009, 3(42):297-302.
- [6] Matsunaka T, Sawamoto T, Ishimura H, et al. Efficient use of digested cattle slurry from biogas plant with respect to nitrogen recycling in grassland[J]. *International Congress Series*, 2006(1293):242-252.
- [7] Kurt Möller, Walter Stinner. Effects of different manuring systems with and without biogas digestion on soil mineral nitrogen content and on gaseous nitrogen losses (ammonia, nitrous oxides)[J]. *European Journal of Agronomy*, 2009, 1(30):1-16.
- [8] Banik S, Nandi R. Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom[J]. *Industrial Crops and Products*, 2004, 3(20):311-319.
- [9] 尹芳, 张无敌, 宋洪川, 等. 沼液对某些植物病原菌抑制作用的研究[J]. 可再生能源, 2005(2):9-11, 36.
YIN Fang, ZHANG Wu-di, SONG Hong-chuan, et al. Research on bacteriostatic activity of biogas broth on plant pathogenic microbes[J]. *Renewable Energy*, 2005(2):9-11, 36.
- [10] 尹芳, 张无敌, 刘士清, 等. 沼液抑制三七镰刀菌的影响因素研究[J]. 中国沼气, 2006, 24(2):51-52, 62.
YIN Fang, ZHANG Wu-di, LIU Shi-qing, et al. Study on affecting factors of biogas Slurry on bacteriostatic activity of *Fusarium Solani*[J].

- China Biogas*, 2006(2):51-52, 62.
- [11] 陈丽琼,尹 芳,张无敌. 沼气发酵液对烟草赤星菌的抑制研究[J]. 可再生能源, 2004(3):22-24.
CHEN Li-qiong, YIN Fang, ZHANG Wu-di, et al. Effect of leaf spray application of anaerobic processed liquid livestock manures against tomato-leaf mould[J]. *Renewable Energy*, 2004(3):22-24.
- [12] 耿玉亮,刘郁文,王泽洋,等.温室蕃茄生产施用沼肥的试验[J].中国沼气, 2000, 38(1):31-32.
GENG Yu-liang, LIU Yu-wen, WANG Ze-yang, et al. Use of biogas fertilizer for greenhouse tomato planting[J]. *China Biogas*, 2000(38):31-32.
- [13] Jothi G, Pugalendhi S, Poomima K, et al. Management of root-knot nematode in tomato *Lycopersicon esculentum*, Mill, with biogas slurry[J]. *Bioresource Technology*, 2003(89):169-170.
- [14] 董晓涛,杨 志. 叶面喷施沼液对番茄苗期叶霉病发生的影响[J]. 广东农业科学, 2009, 11:99-101.
DONG Xiao-tao, YANG Zhi. Effect of leaf spray application of anaerobic processed liquid livestock manures against tomato-leaf mould[J]. *Guangdong Agricultural Science*, 2009(11):99-101.
- [15] 张银虎. 沼液对棉花枯黄萎病的防治及增产效果[J]. 中国棉花, 2008, 35(5):25.
ZHANG Yin-hu. Prevention and the effects of increasing of biogas slurry against cotton dry verticillium wilt[J]. *China Cotton*, 2008, 35(5):25.
- [16] 王永生.沼液沼渣防治当归麻口病试验[J]. 中国沼气, 2010, 28(1):45-46.
WANG Yong-sheng. Management of both biogas slurry and biogas residue prevention of Ma-mouth disease in *Angelica sinensis*[J]. *China Biogas*, 2010, 28(1):45-46.
- [17] 王 芳,马孝林,张荣荣,等.发酵沼液对黄瓜霜霉病菌抑制机理初探[J].宁夏农林科技, 2009(6):23-24.
WANG Fang, MA Xiao-lin, ZHANG Li-rong, et al. Primary study on inhibition mechanism of biogas slurry to cucumber downy mildew[J]. *Ningxia Journal of Agriculture and Forestry Science and Technology*, 2009(6):23-24.
- [18] 刘丰玲,马东辉,刘天宏. 喷施沼液对小麦产量、品质和病虫害防治的影响[J]. 中国沼气, 2009, 27(6):39-41.
LIU Feng-ling, MA Dong-hui, LIU Tian-hong. Effect of biogas slurry on quantity and quality of wheat[J]. *China Biogas*, 2009(27):39-41.
- [19] 李尚金,夏良荣,卫书杰. 应用沼液防治魔芋软腐病技术试验初报[J].湖北植保, 2007, 4:33-34.
LI Shang-jin, XIA Liang-rong, WEI Shu-jie. Effects of biogas slurry on disease control of konjac soft rot[J]. *Hubei Plant Protection*, 2007, 4:33-34.
- [20] 刘国胜. 沼渣、沼液对马铃薯增产及抗逆性试验研究[J].中国马铃薯, 2006, 20(5):282-283.
LIU Guo-sheng. Effect of sediment and liquid of biogas generating pit on yield and disease resistance of potato[J]. *Chinese Potato Journal*, 2006, 20(5):282-283.
- [21] 董晓涛,杨 志,周淑凤. 沼液对黄瓜白粉病的防治效果研究[J]. 辽宁农业职业技术学院学报, 2006, 8(3):25-26, 29.
DONG Xiao-tao, YANG Zhi, ZHOU Shu-feng. The Preventive and curing research of anaerobic processed liquid livestock manures against cucumber powdery mildew[J]. *Journal of Liaoning Agricultural College*, 2006, 8(3):25-26, 29.
- [22] 严克华,王志春. 沼肥对温室草莓产量和品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2009(5):275-276.
YAN Ke-hua, WANG Zhi-chun. Effect of biogas slurry on yield and quality of strawberry under greenhouse[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2009(5):275-276.
- [23] 商春刚. 微滴灌施用沼液技术在草莓生产中的应用效果[J]. 现代农业科技, 2008(14):28.
SHANG Chun-gang. Application effect of biogas slurry on strawberry with micro drip-irrigation[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2008(14):28.
- [24] 黄平华,蒋 华,罗元琼,等. 沼液与赤霉素对草莓产量的影响[J]. 贵州农业科学, 2007, 35(2):105-106.
HUANG Ping-hua, JIANG Hua, LUO Yuan-qiong, et al. Effects of firedamp liquid mixed with gibberellin on yield of strawberry[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2007, 35(2):105-106.
- [25] 赵 玲,刘荣厚,栾敬德. 厌氧发酵残余物对草莓产量、品质及生理效应影响的研究[J]. 中国沼气, 2005, 23(2):20-22.
ZHAO Ling, LIU Rong-hou, LUAN Jing-de. Studies on effect of anaerobic fermentation residues on the yield, quality and physiology in strawberry[J]. *China Biogas*, 2005, 23(2):20-22.
- [26] 赵 玲,栾敬德,刘荣厚. 沼液对草莓植株性状及果实品质的影响[J]. 北方园艺, 2004(2):58-59.
ZHAO Ling, LUAN Jing-de, LIU Rong-hou. Influence of biogas on plant property and fruit quality of strawberry[J]. *Northern Horticulture*, 2004(2):58-59.
- [27] 管莉萍,虞方伯,罗锡平,等. 几种沼液复配农药对小麦雪霉叶枯病菌的抑制效果研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(16):7542-7545.
GUAN Li-bo, YU Fang-bo, LUO Xi-ping, et al. Effect of several pesticide formulations mixed with biogas slurry on the inhibitory of *gerlachia nivalis*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2009, 37(16):7542-7545.
- [28] Liu W K, Du L F, Yang Q C. Biogas slurry added amino acid decrease nitrate concentrations of lettuce in sand culture[J]. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B—Soil and Plant Science*, 2008(2):10-14.
- [29] 陈玉成,杨志敏,陈庆华,等. 大中型沼气工程厌氧发酵液的后处置技术[J]. 中国沼气, 2010, 28(1):14-20.
CHEN Yu-cheng, YANG Zhi-min, CHEN Qing-hua, et al. An overview on disposal of anaerobic digestate for large scale biogas engineering[J]. *China Biogas*, 2010, 28(1):14-20.